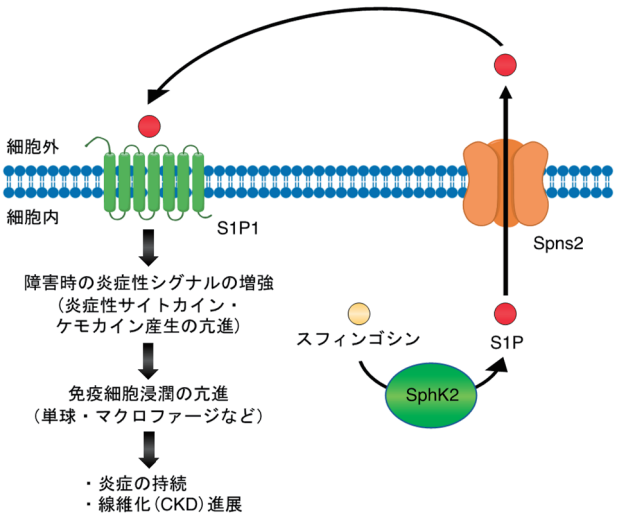
57　S1P輸送体を標的とした慢性腎臓病新規治療薬の開発	田中　真司

【目的】慢性腎臓病（CKD）は多くの場合腎機能の低下を伴い、持続する炎症と進展性の線維化を特徴とする。CKD進展の詳細なメカニズムは不明であり、現在の治療戦略は血圧管理など非特異的なものがほとんどである。スフィンゴ脂質代謝産物であるスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）は、スフィンゴシンキナーゼ（SphK1、SphK2）の働きにより、細胞内でスフィンゴシンから合成され、細胞外へ輸送された後、細胞膜上に存在する G 蛋白質共役型受容体である S1P1-S1P5 のリガンドとして働き、細胞の接着・遊走・増殖など様々な応答を引き起こす。著者の留学先（前所属先）を含む複数の研究室が、これまで全身の *Sphk2* ノックアウトや SphK2 阻害剤投与が CKD 進展（線維化）を抑制することを動物実験で報告してきたが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで著者は、腎臓の線維化進展に重要な役割を果たす perivascular cells（pericytes/fibroblasts）の SphK2 が CKD 進展に寄与する、という仮説を立て、以下の予備実験結果を得た。（1）腎臓の perivascular cells では S1P は主に SphK2 によって産生され、未知のトランスポーターによって細胞外へ輸送される。（2）細胞外の S1P は perivascular cells 自身の S1P1 に結合し、これが腎障害時の perivascular cells 内の炎症性シグナリングを増強させ、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を増加させ、免疫細胞浸潤とそれに続く線維化を促進する。これらを背景に、本研究では、腎臓の perivascular cells に発現する未知の S1P トランスポーターを同定し、その阻害が腎臓の炎症及び線維化を軽減するかを検証することを目的とする。

【方法】腎臓 perivascular cells に発現する S1P トランスポーターとして、内皮細胞ではすでに報告されている Spns2 を候補として検討を行った。細胞実験ではマウス腎臓から単離した primary kidney perivascular cells を用いた。動物実験では、perivascular cell 特異的 Cre マウスとして Foxd1Cre マウスを用い、Spns2 flox マウスと掛け合わせることにより、perivascular cell 特異的 *Spns2* ノックアウトマウスを作製し実験に供した。CKD（腎線維化）モデルとしては、片側腎虚血再灌流モデル（Day 0：左腎虚血再灌流、Day 13：右腎摘、Day 14：採材）を用いた。また臨床応用を見据え、共同研究者と開発した新規 Spns2 阻害剤である SLF1081851 の効果も細胞・動物実験において検証した。

【結果】マウス primary kidney perivascular cells において *Spns2* をノックダウンすると、培地中に含まれる S1P 濃度が低下した。この結果は Spns2 が腎臓 perivascular cells において S1P トランスポーターとして働いていることを示唆する。さらに *Spns2* のノックダウンは、LPS で刺激した際の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現を低下させた。動物実験では、perivascular cell 特異的 *Spns2* ノックアウトマウスでは腎線維化が軽減しており、上記細胞実験結果と合致する所見であった。さらに新規開発した Spns2 阻害剤である SLF1081851 を用いた実験を行い、細胞実験では炎症性サイトカイン・ケモカイン発現の低下、動物実験では腎線維化の軽減、という結果を得た。これらの結果は、新規 CKD 治療薬としての Spns2 阻害剤の有用性を示すものである。

腎臓 perivascular cell における SphK2/Spns2/S1P1 シグナリングは炎症・線維化を促進する



57. S1P 輸送体を標的とした慢性腎臓病新規治療薬の開発

田中　真司

東京大学 医学部附属病院 腎臓・内分泌内科

Key words：スフィンゴシン 1-リン酸，SphK2，Spns2，perivascular cell，慢性腎臓病

緒　言

慢性腎臓病（CKD）は多くの場合腎機能の低下を伴い、持続する炎症と進展性の線維化を特徴とする。CKD の有病率は全世界人口の約 10%とされ、進展すると透析や腎移植を要する末期腎不全に至る他、心血管病の強い危険因子でもあるため、CKD は喫緊の臨床課題であるが、CKD 進展の詳細なメカニズムは不明であり、現在の治療戦略は血圧管理など非特異的なものがほとんどである。

スフィンゴ脂質代謝産物であるスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）は、スフィンゴシンキナーゼ（SphK1、SphK2）の働きにより、細胞内でスフィンゴシンから合成され、細胞外へ輸送された後、細胞膜上に存在する G 蛋白質共役型受容体である S1P1～S1P5 のリガンドとして働き、細胞の接着・遊走・増殖など様々な応答を引き起こす。著者の留学先（前所属先）を含む複数の研究室が、これまで全身の *Sphk2* ノックアウトや SphK2 阻害剤投与が CKD 進展（線維化）を抑制することを動物実験で報告してきたが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで著者は、腎臓の線維化進展に重要な役割を果たす perivascular cells（pericytes/fibroblasts）の SphK2 が CKD 進展に寄与する、という仮説を立て、留学先において以下の予備実験結果を得ていた。(1) 腎臓の perivascular cells では S1P は主に SphK2 によって産生され、未知のトランスポーターによって細胞外へ輸送される。(2) 細胞外の S1P は perivascular cells 自身の S1P1 に結合し、これが腎障害時の perivascular cells 内の炎症性シグナリングを増強させ、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を増加させ、免疫細胞浸潤とそれに続く線維化を促進する。これらの結果を背景に、本研究では、腎臓の perivascular cells に発現する未知の S1P トランスポーターを同定し、その阻害が腎臓の炎症及び線維化を軽減するかを検証することを目的とした。

結果としては、腎臓の perivascular cells に発現する S1P トランスポーターとして Spns2 を同定し、細胞実験・動物実験においてその分子が腎臓の炎症・線維化を促進していることを見出した。さらに共同研究者と開発した新規 Spns2 阻害剤がマウスの腎線維化を軽減することを確認し、新規 CKD 治療薬としての Spns2 阻害剤の有用性を示す結果であった。

本研究成果をまとめた論文を Science Translational Medicine 誌に掲載した［1］。

方法および結果

まず、腎臓 perivascular cells に発現する S1P トランスポーターとして、内皮細胞ではすでに報告されている Spns2 を候補として検討を行った。マウス腎臓から単離した primary kidney perivascular cells において、*Spns2* をノックダウンすると、培地中に含まれる S1P 濃度が低下し（図 1）、Spns2 が腎臓 perivascular cells において S1P トランスポーターとして働いていることを示唆する結果であった。

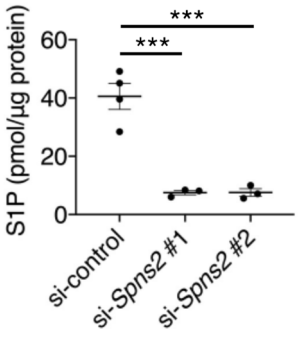


図 1. Spns2 は腎臓 perivascular cells において S1P トランスポーターとして働く
Primary kidney perivascular cells をコントロールおよび Spns2 siRNA（2 種）で処理した際の培養上清中の S1P 濃度。***P<0.001（1-way ANOVA followed by post hoc multiple-comparison test（Tukey's））。

さらに腎臓 perivascular cells における *Spns2* のノックダウンは、LPS で刺激した際の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現を低下させた（図 2）。

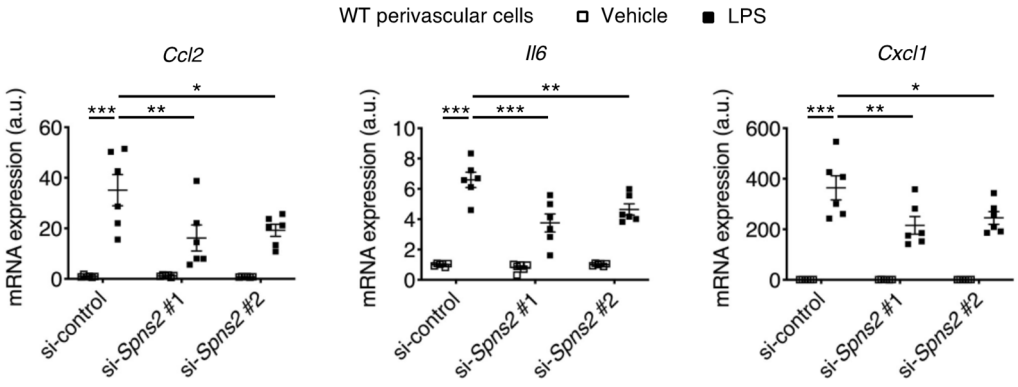


図 2. *Spns2* ノックダウンは腎臓 perivascular cells における炎症性シグナルを減弱させる
Primary kidney perivascular cells をコントロールおよび Spns2 siRNA（2 種）で処理した後、LPS 刺激し（100 ng/mL）、2 時間後に *Ccl2*、*Il6*、*Cxcl1* の mRNA 発現を調べた。
*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001（2-way ANOVA followed by post hoc multiple-comparison test（Tukey's））。

以上細胞実験で示した Spns2 の重要性を動物でも検証するため、perivascular cell 特異的 Cre マウスとして Foxd1Cre マウスを用い、Spns2 flox マウスと掛け合わせることにより、perivascular cell 特異的 *Spns2* ノックアウトマウスを作製した。CKD（腎線維化）モデルとしては、片側腎虚血再灌流モデル（Day 0：左腎虚血再灌流、Day 13：右腎摘、Day 14：採材）を用いた。Perivascular cell 特異的 *Spns2* ノックアウトマウスはコントロールマウスと比較し腎臓線維化が有意に軽減しており、上記細胞実験と合致する結果であった（図 3）。

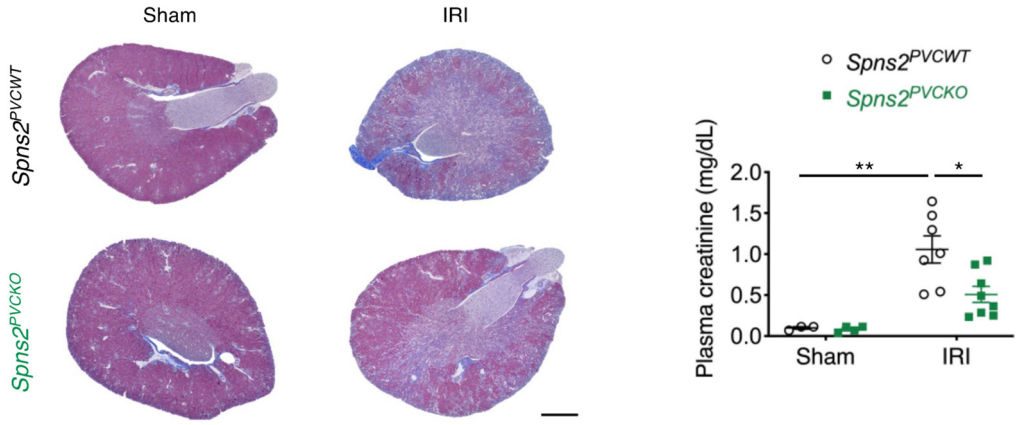


図 3. Perivascular cell 特異的 *Spns2* ノックアウトマウスでは腎臓線維化が軽減する
Foxd1Cre+;Spns2fl/fl（Spns2^{PVCKO}）マウスおよび littermate control（Spns2^{PVCWT}）に片側腎虚血再灌流処置を行い、14 日目に血漿クレアチニンおよび組織（Masson's trichrome 染色、scale bar：1mm）を評価した。*P＜0.05、**P＜0.01（2-way ANOVA followed by post hoc multiple-comparison test（Tukey's））。

最後に臨床応用を見据え、共同研究者と選択的 Spns2 阻害剤である SLF1081851 を開発した。腎臓 perivascular cells を本阻害剤で処理すると、LPS で刺激した際の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が低下した（図 4）。

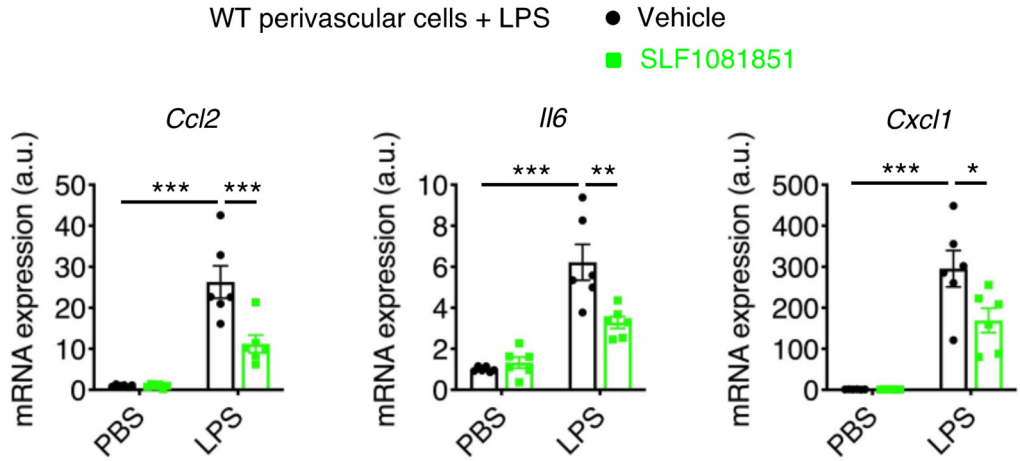


図 4. 選択的 Spns2 阻害剤（SLF1081851）は腎臓 perivascular cells における炎症性シグナルを減弱させる
Primary kidney perivascular cells をコントロールおよび SLF1081851（3 μM）で処理した後、LPS 刺激し（100 ng/mL）、2 時間後に *Ccl2, Il6*、*Cxcl1* の mRNA 発現を調べた。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001（2-way ANOVA followed by post hoc multiple-comparison test（Tukey's））。

また野生型マウスに片側腎虚血再灌流処置を行い、SLF1081851（0、5、10 mg/kg）を連日（Day 4～13）投与し、腎臓線維化を観察したところ、SLF1081851 投与群では腎臓線維化が有意に軽減していた（図 5）。

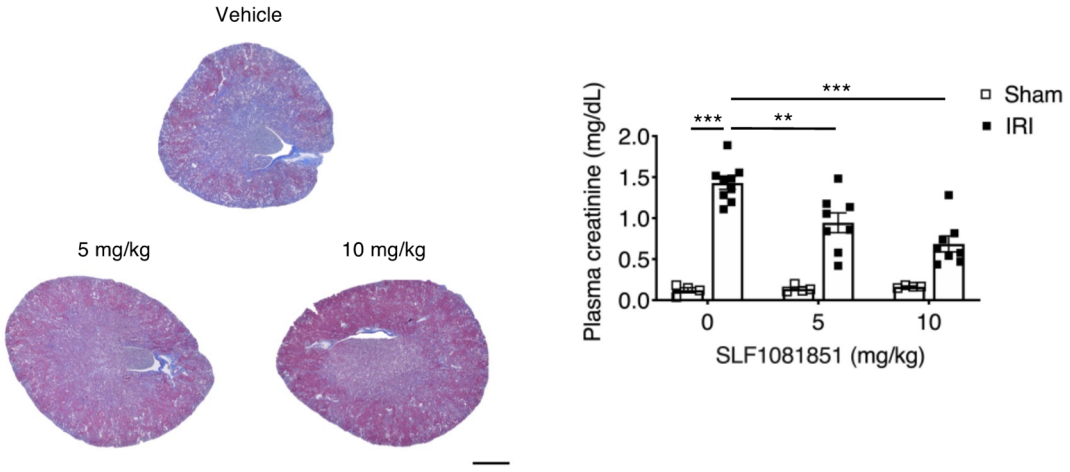


図 5. 選択的 Spns2 阻害剤（SLF1081851）は腎臓線維化を軽減する

野生型マウスに片側腎虚血再灌流処置を行い、SLF1081851（0、5、10 mg/kg）を連日（Day 4～13）投与し、14 日目に血漿クレアチニンおよび組織（Masson's trichrome 染色、scale bar：1mm）を評価した。***P*＜0.01、****P*＜0.001（2-way ANOVA followed by post hoc multiple-comparison test（Tukey's））。

考　察

以上の細胞実験・動物実験は、腎臓に障害が生じた際に、perivascular cells から Spns2 を介して S1P が細胞外に放出され、これが炎症性シグナルを増強する役割を果たし、腎臓の炎症・線維化を促進することを示唆している。我々が新規開発した選択的 Spns2 阻害剤である SLF1081851 の結果からは、新規 CKD 治療薬としての Spns2 阻害剤の有用性が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、Prof. Mark D. Okusa（Division of Nephrology／Center for Immunity, Inflammation and Regenerative Medicine at University of Virginia）、Prof. Kevin R. Lynch（Department of Pharmacology at University of Virginia）、Prof. Webster L. Santos（Department of Chemistry／Center for Drug Discovery at Virginia Tech）である。本研究への研究助成金をいただいた上原記念生命科学財団にこの場を借りて深謝申し上げます。

文　献

1） Tanaka S, Zheng S, Kharel Y, Fritzemeier RG, Huang T, Foster D, Poudel N, Goggins E, Yamaoka Y, Rudnicka KP, Lipsey JE, Radel HV, Ryuh SM, Inoue T, Yao J, Rosin DL, Schwab SR, Santos WL, Lynch KR, Okusa MD. Sphingosine 1-phosphate signaling in perivascular cells enhances inflammation and fibrosis in the kidney. Sci Transl Med. 2022 Aug 17;14(658):eabj2681. doi: 10.1126/scitranslmed.abj2681. Epub 2022 Aug 17. PMID: 35976996; PMCID: PMC9873476.